第25卷 第2期 昆 虫 学 报 Vol. 25, No. 2
1982年5月 ACTA ENTOMOLOGICA SINICA May, 1982

日本金龟蝉芽孢杆菌的人工培养

冯祥兴 幸兴球 杨明华
（中国科学院动物研究所）

摘要 在日本金龟蝉芽孢杆菌（*Bacillus popilliae* Dutky）的人工培养研究中，我们从含有硫胺素的J平板培养基上得到一个菌株——SH-m5株。这个菌株在含有鸡血的JVB培养基上长得更好。在JV液体培养基中，芽孢形成率可达50—60%。用JV培养基制备的菌剂，通过注射和喂食感染试验，对华北大黑鳃金龟，铜绿丽金龟和黄色蔗龟都有一定的致病力。

日本金龟蝉芽孢杆菌（*Bacillus popilliae* Dutky）是一种重要的昆虫病原菌，从本世纪50年代起就作为杀虫剂销售使用。但是，由于这种菌剂仅能通过活体接种制备，过程繁琐，生产有限，严重地影响了它的推广应用。其人工培养的研究一直受到各方重视，近十年来取得了一定的进展。1965年Rhodes等首先分离和报道了一株在固体培养基上能生长的NRRL-B-2309S菌株，但芽孢形成率只有0.1—0.3%。Sharpe（1970, 1973）对该菌株进行反复培养研究，改良培养条件（主要是使用MYPT培养基），得到了一株在人工培养基上生长较好的NRRL-B-2309M菌株。芽孢形成率可达20—30%。所得的培养物通过活体放血进行喂食试验有一定的致病力（Sharpe, 1970）。1979年作者对山东省花生研究所分离的一个菌株——鲁乳1号[即华北大黑鳃金龟乳状菌（宋协松等，1980）]进行培养研究，得到一株在人工培养基上生长良好的菌株——SH-m 5株，芽孢形成率可达50—60%。人工培养的菌剂进行注射和喂食试验，对华北大黑鳃金龟（*Holotrichia oblita* Fald.）均有较好的效果。本文报道对它的研究结果。

材 料 与 方 法

一、菌株 山东省花生研究所分离的鲁乳1号——山东省花生研究所赠送。

二、培养基 MD培养基（Sharpe, 1970）; MYPT培养基（Sharpe, 1970, 1973）; J培养基（St. Julian, 1963）; JV培养基——J培养基中加入0.01克/升盐酸硫胺素，固体培养基加2%琼脂; JVB培养基——JV培养基8磅30分钟高压灭菌，冷却到50℃左右无菌加入5—10%去纤维鸡血并做成平板，25℃保温48小时后使用。

三、分离方法 将鲁乳1号血涂片按常规制成菌液，通过血腔注射重新感染华北大黑鳃金龟幼虫。待虫体内杆菌芽孢成熟时，取菌血按Milner间歇灭菌法（Milner, 1977）加入发芽培养基（酵母膏0.5%，葡萄糖0.1% pH 6.5），每隔1—2小时70℃20分钟处理

本文于1980年12月收到。
广东省甘蔗研究所邝乐生、梁惠琼同志和广东省顺德县农科所陈顺添同志参加了部分工作；我所王庆芬同志协助采虫，全国强同志拍摄照片，特此致谢。

1 次，共 5—7 次。将经过最后一次热处理的菌悬液直接或稀释涂布在上述培养基上。

四、菌剂制备 将 50 毫升 JV 培养液注入 500 毫升三角瓶中，8 磅 30 分钟灭菌后接入 JV 斜面培养 48 小时的 SH-m 5 菌，经 30℃ 摇床培养 48—50 小时取出 1 毫升接入 50 毫升新鲜 JV 培养液中，再经摇床培养 48—50 小时至孢囊明显时中止。所得培养物 (1) 按 Dulmage 法回收 (Dulmage, 1970)，所得菌粉含芽孢 2000 亿/克；(2)加入土豆粉拌匀后凉干，所得菌粉含芽孢 100 亿/克。

五、致病力测定

1. 虫种 从野外采集华北大黑鳃金龟，铜绿丽金龟 (*Anomola corpulenta* Mots.) 和黄色蔗龟 (*Exolontha serrulata* (Gyllenhal))，室内饲养 3—5 天后，选 3 龄健康幼虫供注射和喂食用。

2. 注射试验 按一般注射方法 (张书芳等，1975) 进行，每头虫注射 3 微升，含菌 1×10^6。

3. 喂食试验 将一定量的菌粉和小麦粒均匀混合凉干，每粒小麦约有芽孢 3 亿。罐头瓶中装上多半瓶湿土(湿土是从玉米地采回，并用 1 平方毫米的筛孔过筛后加入适量的水调制而成)，每瓶放入 4 头 3 龄幼虫和带菌麦粒 100 粒，置 25℃ 温箱中饲养。

结 果

一、SH-m 5 株的分离 用 Milner 间歇灭菌法处理后的菌液涂布在 MD, MYPT 和 J 培养基平板上，经过反复接种均未有菌落长出。但在 J 培养基中加入硫胺素 (即 JV 培养基)时，可看到少数菌落出现。用 JVB 培养基分离培养时则可出现更多的菌落。这些菌落呈圆形，表面光滑，中间略有突起，深灰白色(图版 I: 1)。营养体单个或成双，2.8 × 0.6 微米(图版 I: 2)。芽孢囊中间膨大呈椭圆形，2.7 × 1.2 微米。芽孢中位或在一侧形成，副孢位于芽孢的一端，芽孢 1.3 × 0.7 微米，折光性较强(图版 I: 3)。本文将在 JV 和 JVB 平板上得到的这个菌株称为 SH-m 5。

SH-m 5 株在 JVB 平板上 28℃ 下一般 48 小时开始形成芽孢，72—96 小时大部分形成芽孢。副孢与芽孢明显隔开，最后大部分副孢脱落。在芽孢形成过程中，可看到一些孢囊中副孢先产生。从平板上长出的菌落转入 JV 斜面后 SH-m 5 株生长较好，芽孢形成情况与在 JVB 平板上相似，所以后来的菌剂制备都使用不含有鸡血的 JV 培养基。

将 SH-m 5 株的斜面培养物制成悬液回接华北大黑鳃金龟幼虫，一般 48 小时左右出现营养体，72 小时后芽孢大量形成。液体三角瓶摇床培养中芽孢形成和在华北大黑鳃金龟幼虫中的情况相同。

二、SH-m 5 株的致病力 从表 1 和表 2 可以看到，人工培养制备的 SH-m 5 菌粉对

表 1 菌剂注射对蛴螬的致病力

虫 种	虫数(头)	剂量芽孢/头	死亡虫数	致病率(%)
华北大黑鳃金龟 (*Holotrichia oblita* Fald.)	50	1×10^6	45	90
铜绿丽金龟 (*Anomola corpulenta* Mots.)	30	1×10^6	18	60
黄色蔗龟 (*Exolontha serrlata* (Gyllenhal))	50	1×10^6	40	80

表 2　菌剂拌麦种对蛴螬的致病力

虫　　种	虫数(头)	剂量芽孢/头	死亡虫数	致病率(%)
华北大黑鳃金龟 (*Holotrichia oblita* Fald.)	60	8×10^9	36	60
铜绿丽金龟 (*Anomola corpulenta* Mots.)	10	8×10^9	3	30

金龟子幼虫都有一定的致病力，特别对华北大黑鳃金龟幼虫效果较好。注射剂量 1×10^6 芽孢/头，对华北大黑鳃金龟的致病率为 90%，铜绿丽金龟为 60%，黄色蔗龟为 80%；喂食剂量 8×10^9 芽孢/头，对华北大黑鳃金龟及铜绿丽金龟的致病力分别为 60% 及 30%。最早出现死亡的时间，注射为 36 小时，喂食为第 4 天后。濒死幼虫取血镜检，其内充满营养体，芽孢很少，虫体不呈明显的乳白色。幼虫死后约 12—24 小时芽孢方大量形成。

讨　论

虽然一些作者曾报道在 MD. MYPT, J 等培养基上日本金龟岬芽孢杆菌 NRRL-B-2309M 菌株和其他一些菌株生长良好，并能形成一定量的芽孢，但是我们用这些培养基对国内分离的一些菌株及美国引进的 *B.popilliae* Dutky 菌株进行培养均未发现长出菌落。仅在 JV 培养基平板上培养鲁乳才开始看到菌落形成，后来在 JVB 平板上也看到同样的菌落。通过本项试验可以看出，JV 培养基中添加硫胺素对乳状菌的人工培养是十分重要的。间歇热处理后的菌在 JV 和 JVB 平板上能长出纯一的 SH-m 5 菌落。显微镜观察 SH-m 5 株的形态与乳状菌的菌株特点基本相同，营养体为单个或双个相连，芽孢囊膨大并形成副孢。副孢先于芽孢生成的现象与 Rhodes 的评述相符 (Dulmage 和 Rhodes, 1971)——乳状菌在活体内一般先形成芽孢再形成副孢。在人工培养基上的孢囊，一般是先形成副孢再形成芽孢。孢囊与营养体的大小有变异，孢囊比原株略小。

已报道 NRRL-B-2309M 株的人工培养物通过注射可以引起感染，但直接喂食没有结果。只有从注射感染的虫体上取出的菌液才可以感染 (Sharpe, 1970)。本文致病力试验表明，SH-m 5 株的人工培养物无论通过注射或喂食都有一定的效率，而且感染较快，在营养体阶段幼虫便濒近死亡。

由于 SH-m 5 株在人工培养基上容易大量培养，对华北大黑鳃金龟、铜绿丽金龟和黄色蔗龟都有一定的致病力。我们认为进一步探讨和应用推广乳状菌这一菌株是有意义的。

参　考　文　献

张书芳等　1975　乳状菌与金龟子。昆虫知识 **12**(2): 43。

宋协松等　1980　花生蛴螬乳状病原菌的初步研究。昆虫知识 **17**(4): 161—3。

Costilow, R. N., C. J. Sylvester and R. E. Pepper 1966 Production and stabilization of cells of *Bacillus popilliae* and *Bacillus lentimorbus*. *Appl. Microbiol.* **14**: 161—9.

Dutky, S. R. 1940 Two new spore-forming bacteria causing milky disease of the Japanese beetle larvae. *J. Agric. Res.* **61**: 57—68.

Dulmage, H. T. and R. A. Rhodes, 1971 Production of *Bacillus popilliae* in vitro. In "Microbial control of insects and mites" p. 525—40.

Dulmage, H. T., J. A. Correa, and A. J. Martinez, 1970 Coprecipitation with lactose as a means of recovering the spore-crystal complex of *Bacillus thuringiensis*. *J. Invert. Pathol.* **15**(1): 15—20.

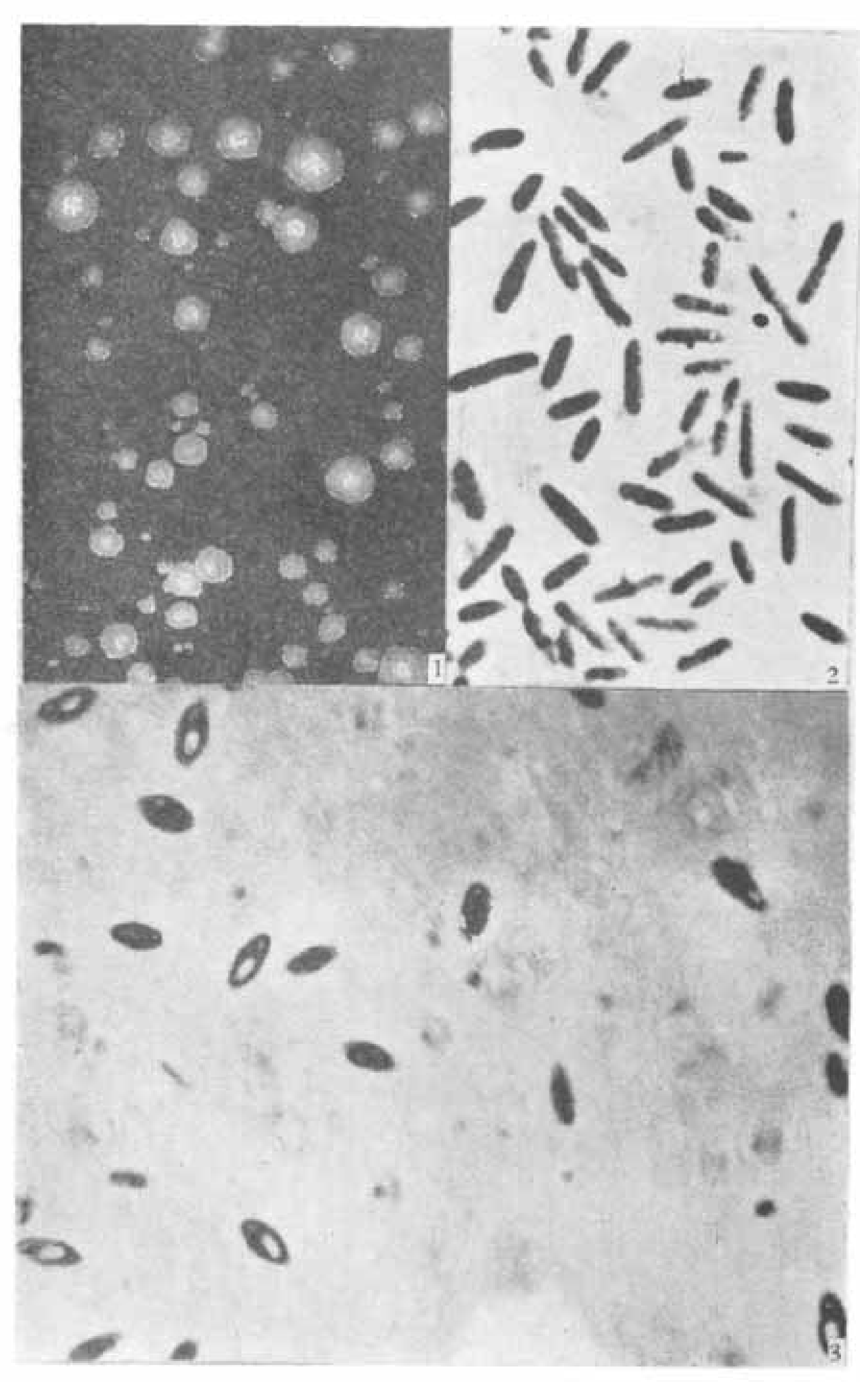
Miner, R. J. 1977 A method for isolating milky disease, *Bacillus popilliae* var. *rhopaca* spores from the

soil. *J. Invert. Pathol.* 30(3): 283—7.
Rhodes, R. A., M. S. Roth, and G. R. Hrubant. 1965 Sporulation of *Bacillus popilliae* on solid media. *Can. J. Microbiol.* 11: 779—83.
Schwartz, P. H., Jr, and E. S. Sharpe 1970 Infectevity of spores of *Bacillus popilliae* produced on a laboratory medium. *J. Invert. Pathol.* 15(1): 126—8.
Sharpe, E. S., G. St. Julian and C. Crowell 1970 Characteristics of a new strain of *Bacillus popilliae* sporogenic in vitro. *Appl. Microbiol.* 19: 681—8.
Sharpe, E. S. and R. A. Rhodes. 1973 The pattern of sporulation of *Bacillus popilliae* in colonies. *J. Invert. Pathol.* 21(1): 9—15.
Steinkraus, K. H. and H. Tashiro. 1955 Production of milky disease spores (*Bacillus popilliae* Dutky and *Bacillus lentimorbus* Dutky) on artificial media. *Science* 121: 873—4.
St. Julin, G. E. Sharpe, and R. A. Rhodes. 1970 Growth pattern of *Bacillus popilliae* in Japanese beetle larvae. *J. Invert. Pathol.* 15(2): 240—6.
St. Julian, G. Jr., T. G. Pridham. and H. H. Hall. 1963 Effect of diluents on viability of *Popillia Japonica* Newman larvae, *Bacillus popilliae* Dutky and *Bacillus lentimorbus* Dutky. *J. Insect Pathol.* 5(4): 440—50.

CULTIVATION OF *BACILLUS POPILLIAE* ON ARTIFICIAL MEDIA

FENG XIANG-XING　SHING SHING-CHIU　YANG MING-HUA
(*Institute of Zoology, Academia Sinica*)

In the study of *Bacillus popilliae* Dutky on artificial media, a strain of *B. popilliae*, SH-m5, has been isolated on plate of medium containing thiamine. This strain also shows better growth on JVB medium to which was added blood of chicken. In JV liquid medium the rate of sporulation of strain SH-m5 was 50—60%. The preparation of strain SH-m5 cultured in JV medium was used in the infestive test by injection and feeding. The result has shown that this strain has pathogenicity against 3 species of white grubs (*Holotrichia oblita* Fald., *Anomala corpulenta* Mots., *Exolontha serrulata* (Gyllenhal)).



1. SH-m 5 株的菌落形态 ×3.5
2. SH-m 5 株的营养体形态 ×4410
3. SH-m 5 株的孢囊形态 ×3150